

На правах рукописи

Мухаметшина Регина Талгатовна

**ИНТЕГРИНЫ БЕТА 2 И БЕТА 6
- НОВЫЕ МАРКЕРЫ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ
КЛЕТОК ТИПА II**

03.01.04 –биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань- 2014

Работа выполнялась в Казанском (Приволжском) федеральном университете (г. Казань, Россия) и в Институте исследований сердца и легких им. Макса Планка (г.Бад-Наухем, Германия).

Научные руководители: д.б.н., проф.
Багаева Татьяна Вадимовна

д.б.н., PhD., **Гильермо Баррето**

Официальные оппоненты: д.б.н., проф., ведущий научный сотрудник лаборатории Окислительно-восстановительного метаболизма Каз НЦ РТ – **Каримова Фатима Габдуллазяновна**
к.б.н., заведующий отделом культивирования и идентификации вирусов Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями – **Уразов Наиль Гумерович**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр токсикологической радиационной и биологической безопасности»

Защита диссертация состоится « » 2014 в часов на заседании диссертационного совета при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный Университет» по адресу: г. Казань, ул. К.Маркса, 74. В зале заседания ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им.Н.И.Лобачевского ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г.Казань, ул. Кремлевская,18.

Автореферат разослан « » 2014 г

Ученый секретарь

Диссертационного совета:

Доктор биологических наук, профессор

З.И.Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Важную роль в нормальном функционировании и восстановлении поврежденных легких выполняют эпителиальные клетки, в том числе, альвеолоциты II.

Повреждения альвеолоцитов II типа нарушают транспорт ионов, что препятствует оттоку жидкости из альвеолярного пространства (Modelska et al.//American Journal of Physiology. 1999.-P.844-857). Поскольку клетки АТII способны к дифференцировке в альвеолоциты I типа, их повреждение препятствует процессу восстановления целостности альвеолярной стенки. Нарушение структуры альвеолярного эпителия приводит к обнажению базальной мембраны, и на ней образуются волокна фибрина, что приводит к образованию «гиалиновых мембран» (Nishioka et al.//The Journal of Medical Investigation. 2013.- V. 60.- P.175-183). Тяжелое повреждение альвеолярного эпителия и нарушение его репарации приводит к легочному фиброзу (Войтковская и др.// Вестник клинической медицины.- 2012.- Т.5.- С.60-62). Кроме того, альвеолоциты II синтезируют сурфактант. Это комплекс веществ, состоящий из фосфолипидов и специфических сурфактант-ассоциированных белков. Он выполняет многие функции: стимулирует фагоцитоз альвеолярных макрофагов, стабилизирует альвеолоциты, агрегирует бактерии и вирусы, снижает темпы развития системной воспалительной реакции. Однако главной функцией сурфактанта является предотвращение полного коллапса альвеол в период выдоха, что обусловлено его способностью создавать

поверхностное натяжение в легких (Puligandla, The Journal of Applied Physiology, 2000.- V.88.- P.1061-1071). Нарушение синтеза сурфактанта приводит к тяжелым формам заболеваний легких, в том числе, синдрому острого повреждения легких, острому респираторному дистресс-синдрому, включающим тяжелый острый респираторный синдром, муковисцидоз и идиопатический фиброз легких.

В 1977 году Мейсон и Уильямс разработали концепцию альвеолярных клеток типа II (АТII), как клеток защитников альвеол (Mason et al.// Federation proceedings. 1977.- V. 36. – P. 2697-2702.). Их способность к синтезу сурфактанта, участие в регуляции баланса альвеолярной жидкости, коагуляции/фибринолиза, дифференцировка в клетки АТИ и способность к удалению апоптотических АТII клеток путем фагоцитоза, способствуя тем самым восстановлению эпителия, полностью соответствует данной концепции. Кроме того, клетки АТII могут функционировать в легких в качестве иммунорегуляторных клеток (Fehrenbach et al.//Respiratory Research, 2001.- V. 2. - P. 33-46).

Интерес, проявляемый исследователями разных стран к альвеолярным клеткам, связан также с их возможной ролью в качестве стволовых клеток. Роль стволовых клеток многообразна. Они являются основой для формирования различных тканей и органов, способны к активному росту и размножению. В работе Кима с соавторами (Kim et al.// Cell. 2005. V.121. - P. 823-835) было отмечено, что базальные клетки, «клетки Клара» вместе с

альвеолярными клетками типа II могут быть первичными стволовыми клетками эпителия легких.

В литературе имеются данные о процентном соотношении некоторых из изученных типов клеток легких, так - эпителиальные клетки типа I составляют 8% клеток от общего количества; 16% приходится на долю АТII и АТИ клеток; эндотелиальные клетки капилляров, составляют 30% клеток легких; на клетки интерстициального пространства приходится 37%, а количество альвеолярных макрофагов варьирует. Сравнение межвидовой характеристики клеток в альвеолярной области легких людей и крыс в норме показало, что процентное содержание клеток, их средняя толщина, размер и площадь занимаемой поверхности, было относительно постоянным у исследованных организмов (Crapo et al.//The American review of respiratory disease. 1982.- V. 126. - P. 332-337).

Для характеристики различных типов клеток необходимы специфические молекулярные маркеры, которые позволяют контролировать и идентифицировать происходящие в структуре легких процессы, выяснять механизмы взаимоотношений между различными типами клеток, идентифицировать присутствие стволовых клеток или возможность возникновения тяжелых заболеваний.

Поиск специфических маркеров, которые могут быть использованы для сортировки и обогащения, определенных субпопуляций клеток, в том числе, альвеолярного типа II (АТII), является актуальной задачей, решение которой позволит получить

новые данные о функционировании данных клеток в легких, выяснить структурные и функциональные особенности их белков, участвующих в различных физиологических процессах.

В настоящее время определены уникальные молекулярные маркеры для некоторых типов клеток легких, например, альвеолярные клетки типа I – имеют маркер T1 α (Williams// The Annual Review of Physiology. 2003. V. 65. - P. 669–695), для альвеолярных клеток II типа используется сурфактантный белок-С (Fehrenbach, Respiratory Research. 2001.- V. 2. - P. 33-46), белок CCSP - маркер клеток Клара (Kim et. al.// Cell.- 2005.- V.121.- P.823-835), однако, для большинства клеток специфические маркеры еще не найдены.

Цель работы – поиск новых поверхностных маркеров альвеолярных клеток типа II и выяснение их участия в отдельных физиологических процессах, протекающих в клетках.

Основные задачи исследования:

1. Выделить суммарную фракцию специфических белков, характерных для клеток АТII, и определить в их составе наиболее активно экспрессирующиеся интегрины;
2. Установить принадлежность и внутреннюю локализацию наиболее активно экспрессирующихся интегринов;
3. Исследовать популяцию клеток АТII цитометрическим методом, с использованием специфических антител для выбранных интегринов
4. Доказать возможность использования специфических антител в качестве маркеров клеток АТII;

5. Выявить физиологическую значимость выбранных интегринов в газообмене, в дифференцировке клеток и других процессах.

Положения, выносимые на защиту:

- Интегрины бета- 2 и бета- 6 являются специфическими маркерами альвеолярных клеток типа II;
- Интегрин бета- 2 функционально значим для нормального функционирования легких, влияя на процесс газообмена легких и принимая участие в опосредованной негативной регуляции Wnt сигнализации.

Научная новизна работы. Впервые установлено, что в составе клеток альвеолярного типа II, имеются мембранные белки, которые специфичны для клеток данного типа. Установлено, что два белка, а именно интегрины бета-2 и бета-6, могут быть использованы в работах с клетками легких, в качестве маркеров.

Впервые доказано наличие в легких мыши двух различных субпопуляций клеток АТII, содержащих в своем составе интегрины бета-2 и бета-6.

Впервые установлено, что интегрин бета-2 физиологически значим в организме животного. Так, его отсутствие приводит к нарушениям нормального газообмена легких. Кроме того, получены приоритетные данные о функциональной связи клеток АТII с Wnt-сигнализацией. Доказано, что интегрин бета-2 принимает участие в опосредованной негативной регуляции Wnt сигнализации клеток,

т.е. он влияет на процесс эмбриогенеза, дифференцировки клеток и другие процессы.

Практическая значимость работы. Выявленные нами новые, специфичные, поверхностные маркеры (интегрины бета-2 и бета-6) позволят увеличить возможности получения обогащенной однородной популяции клеток АТII типа, изучение которых расширит наши знания в области функционирования данных клеток в организме.

Интегрины бета-2 и бета-6 могут быть использованы в качестве диагностических белков, характеризующих присутствие клеток АТII в легких, нарушение функционирования которых приводит к различным тяжелым заболеваниям.

Результаты исследований о физиологической значимости интегрин бета-2 в процессах газообмена и дифференцировке клеток легких будут полезны для практического применения при разработке новых лекарственных препаратов регуляторного действия.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа проводилась в соответствии с планом НИР Казанского (Приволжского) федерального университета «Молекулярно-генетические, клеточные и популяционные основы функционирования живых систем» (№ регистрационной заявки 1. 14.066.11.9.06Д), а также при поддержке программ „LOEWE-Initiative der Landesförderung“ (III L 4 – 518/15.004, 2009 года) и Немецкого Фонда научных исследований (ВА 4036/1-1).

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на 1 Международной научной интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2012), на Отчетном годовом семинаре Института Исследований легких и сердца им. Макса-Планка (Бад Наухем, Германия, 2012), на 2 Международной научной интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2013), на конференции по исследованию легких «Deutsches Zentrum für Lungenforschung Conference» (Бад Наухем, Германия, 2013), Международной научно-технической конференции «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы (Казань, 2013), на 1 Научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии» (Казань, 2013), на Итоговых научных конференциях КФУ.

Личный вклад автора. Благодаря исследованиям, проведенным диссертантом были выявлены новые специфические маркеры альвеолярных клеток типа II, что позволит решить проблему получения обогащенной однородной популяции клеток типа АТII и расширит наши знания о функционировании данных клеток в организме.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 статьи в реферируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы. Общий объем диссертации 108 страниц. Диссертация включает разделы: введение, обзор

литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы. Работа содержит 4 таблицы и 27 рисунков. Список литературы включает 131 источник, в том числе 120 работ зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали мышей двух видов: мыши дикого типа (WT, C57BL/6) были получены из лаборатории Чарльза Ривера (г. Уилмингтон США); мыши, с нокаутом гена интегрина бета-2 ($\beta 2$ Integrin-deficient) - из лаборатории кафедры Дерматологии и аллергических заболеваний Медицинского факультета Университета Ульма (г.Баден-Вюртемберг, Германия).

Эпителиальные клетки легких мышей (MLE-12, ATCC CRL-2110), нормальные клетки легких мышей (MLG, ATCC CCL-206), фибробласты мышей (NIH/3T3, ATCC CRL-1658) и мезенхимные клетки плода легких мышей (MFLM-4) были получены из Американской коллекции типовых культур.

Выделение клеток АТII легких мыши проводили по методу, предложенному в работе Корти с сотрудниками (Corti et al.// Am J Respir Cell Mol Biol.1996.- V.14.-P.309-315).

Культивирование клеточной культуры АТII осуществляли в чашках Петри, покрытых фибронектином. Культивацию вели в течение трех дней в медиуме-DMEM (D-MEM/F-12 (1:1) Life Technologies), содержащим 10% эмбриональной бычьей сыворотки, с добавлением 1% пенициллина / стрептомицина.

Клетки выращивали в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37° C (Corti et al.// Am J Respir Cell Mol Biol.1996.- V.14.-P.309-315).

Изучение экспрессии генов альвеолярных клеток, проводили с помощью иммунного окрашивания, используя специфические антитела и красители.

Получение суммарной РНК и полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией осуществляли с использованием набора Rneasy Kit (Invitrogen).

Вестерн-блоттинг белка проводили по методу Майера (Maier et al.// Proc Natl Acad Sci USA. - 2012. - V. 109. - P. 11794-11799).

Анализ проточной цитометрии осуществляли по методу Волкаерта (Volckaert et al.// J clin Invest.- 2011.-V.121.-P.4409-4419) и использовали, как для оценки экспрессии маркеров клеточной поверхности со специфическими антителами, так и для определения этапа активации интегринов бета-2 и бета-6.

FASP метод и изоляцию мембранных белков осуществляли по методу Вишневского (Wisniewski et al.// Methods Mol Biol. – 2009. - V. 528. - P. 127-134).

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием ряда систем и приборов системы наноплоу (nanoflow) Agilent 1200 LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) по методу Коха (Cox et. al.// Nat Protoc. –2009.- V. 4. - P. 698-705).

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel-2007. Все данные в работе представлены в виде средней \pm стандартной ошибки (среднее \pm SEM). Для анализа дисперсии (ANOVA) были использованы

значения уровней между группами и значений P. Значения P вычисляли после однофакторного дисперсионного анализа, * P \leq 0,05; ** P <0,01 и *** P <0,001.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска специфических маркеров, которые могли быть использованы для сортировки и обогащения клеток АТII был применен протеомный анализ. Этот анализ позволяет проводить одновременное изучение многих индивидуальных белков, совокупность которых составляет определенную систему, которая характеризует исследуемый объект, как целостную систему, функционирующую в данных условиях. Кроме того, протеомный анализ позволяет исследовать синтез определенных специфических белков, возможную их модификацию и другие изменения, происходящие в исследуемом объекте.

С этой целью первоначально необходимо было получить культуру альвеолярных клеток типа II и выделить из них суммарную фракцию белков.

1. Получение и культивирование клеток АТII и MLE-12

С этой целью из легких мыши по протоколу, предложенному ранее Корти с сотрудниками (Corti et al., 1996) была изолирована первичная культура клеток АТII, которая культивировалась в специфических для данных клеток условиях с целью получения необходимой биомассы. Параллельно культивировались клетки легочного эпителия (MLE-12). Данные клетки были необходимы для сравнительного анализа белков различных клеток, с целью доказательства их специфичности.

Используемые клетки предварительно смешивались с клетками «целого легкого» SILAC-мышей, имеющими в своем составе стабильные изотопы, связанные с определенными аминокислотами, в соотношении 1:1. Этот метод является метаболической стратегией маркировки белков для их количественного протеомного анализа. Вес клеток, использованных для получения белка с мечеными клетками, соответствовал весу клеток контроля.

2. Масс-спектрометрический анализ белков АТII и MLE-12 клеток

2.1. Определение принадлежности изолированных белков к клеточным органеллам

Исследования принадлежности белков, выделенных из альвеолярных клеток типа II, к определенным клеточным органеллам, показали, что в наибольшее их количество (90%), приходится на долю мембранных органелл клеток. Из них примерно 48% были отнесены к мембранной части клеток, 33% - к интегральной мембране, 10% белков связано с Аппаратом Гольджи, 6% отнесены внеклеточной области, а оставшиеся 3% белков не были определены (рис.1).

Таким образом, результаты исследований показали, что основная часть изолированных белков из альвеолярных клеток типа II относятся к мембранными протеинами.



Рис.1. Принадлежность изолированных белков к клеточным органеллам при применении масс-спектрометрического анализа, с использованием программы Gorilla.

2.2. Экспрессия генов, ответственных за синтез мембранных белков клеток альвеолярного типа II

Следующим этапом изучения белков альвеолярного типа II был анализ экспрессии их генов и определение месторасположения изучаемых белков в клетках.

Используя метод параллельного анализа экспрессии множества генов с помощью микрочипов, удалось сгруппировать гены близкие по профилям экспрессии и сравнить их присутствие в различных типах клеток.

Результаты проведенных исследований представлены на диаграмме, где можно наблюдать распределение белков клеток АТII в сравнение с клетками MLE-12 типа (рис. 2).

Как показали полученные результаты и проведенные расчеты профилей, в выделенных фракциях белков имеются белки специфичные только для клеток АТII. Это белки удаленные

от центра (с минусовыми значениями, начиная от -2,5 до -5), поскольку центральные белки характерны и для других клеток.

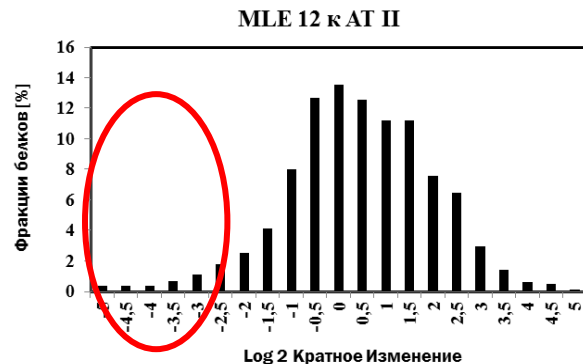


Рис.2. Соотношения Фракций белков (вертикальная ось в процентах) с кратными Изменениями (Горизонтальная ось Log2) клеток MLE-12 и клеток АТ II.

Контролем, полученных результатов служили данные, где было проведено сравнительного исследование содержания белков АТII относительно клеток «целого легкого» (стандарт) (рис. 3).

Результаты исследований показали, что в клетках «целого легкого» наблюдается экспрессия генов белков характерных для клеток АТII. Однако количество синтезируемого ими белка, принадлежащего клеткам АТII, было в 1,5-1,7 раз меньше, по сравнению с количеством белка, полученного из самих клеток АТII.

Вторым контролем данного эксперимента были результаты сравнительного анализа экспрессии генов клеток MLE12 по сравнению с экспрессией генов «целого легкого» (рис.4).

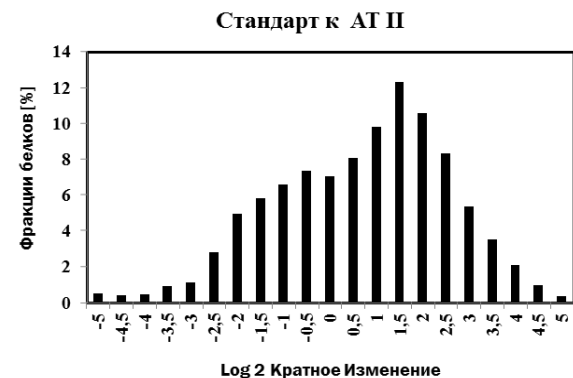


Рис.3. Соотношения Фракций белков (вертикальная ось в процентах) с Кратными Изменениями (Горизонтальная ось Log2) в целом легком и альвеолярных клетках типа II.

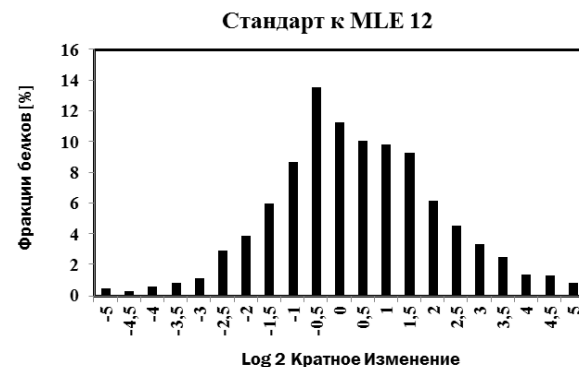


Рис.4. Соотношения Фракций белков (вертикальная ось в процентах) с Кратными Изменениями (Горизонтальная ось Log2) в целом легком и в клетках MLE-12.

Эксперименты показали, что экспрессия генов клеток MLE-12, по сравнению с клетками «целого легкого», отличается незначительно. Это говорит о том, что суммарный белок клеток MLE-12 типа более близок по своему составу, к белкам клеток целого легкого и возможно не имеет специфических белков.

Выявленные спектры специфических белков клеток АТII были изучены в сравнении со спектрами белков других клеток (более 4 тыс. наименований), у которых определено их месторасположение в клетках, принадлежность к определенной линии клеток и их специфичность (рис.5).

Результаты исследований показали, что основная масса анализируемых белков клеток АТII, также как и белков клеток MLE-12 типа, характерна для «целого легкого». Однако немало белков удалено от центра и расположено в установленной области (-2,5)-(-5,0) характерной для альвеолярных клеток типа II.

Дальнейшее изучение и сравнение базы данных транскриптом и протеомной базы изучаемых клеток, путем расчета соотношения экспрессии генов в клетках MLE-12, в сравнении с клетками АТII, и в сравнение с соответствующим количеством общего белка, характерного для клеток легких мышей, показало, что в клетках АТII, идентифицируются 26 генов, которые экспрессируются в клетках АТII на высоком уровне.

Название генов, их идентификационный номер в базе UniProt, клеточная локализация, месторасположение по отрицательным и положительным значениям, а также расположение генов по цвету и фигуре, представлены в таблице 1

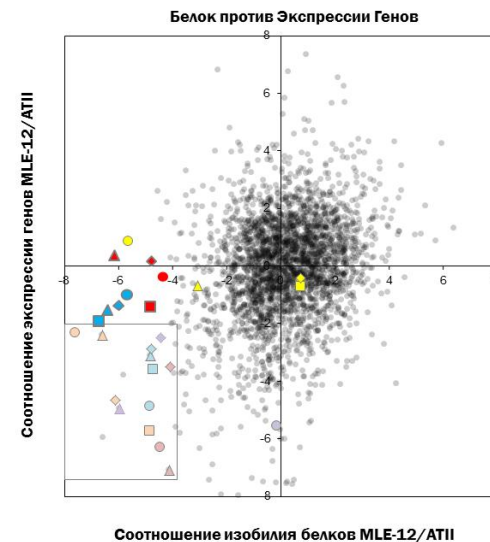


Рис.5. Определение специфических мембранных белков, потенциальных маркеров для клеток АТII, путем расчета соотношения экспрессии генов в клетках MLE-12 в сравнении с клетками АТII.

Анализируя полученные данные по экспрессии представленных генов и расположению соответствующих им белков, можно было предположить, что среди представленных высоко экспрессируемых белков клеток АТII, есть белки, которые могут быть их потенциальными поверхностными маркерами.

3. Выявление белков, способных выполнить роль маркеров клеток АТII

Дальнейший скрининг белков 26 специфических генов, характерных для клеток АТII по критериям, характеризующим состав их пептидов, уникальность структурных элементов, по оценке эффективности обменов при упорядоченности n элементов (Log 2 кратное Изменение), выявил только два белка - интегрин

бета-2 (Itgb2) и интегрин бета-6 (Itgb6), которые по своим характеристикам могли быть маркерами для альвеолярных клеток типа II (табл.1).

Таблица 1.

Экспрессия генов белков различных клеток, соответствующих белкам клеток АТII

Gene name	Single Uniprot	Location	log ML12/AT2	1/CHIP ML12/AT2	Figure
ITGA2	Q62469	membrane part	-5,62	0,85	
ITGB2	P11835	membrane fraction	-5,92	-4,96	
ITGB6	Q9Z0T9	membrane part	-4,40	-2,50	
CLU	Q06890	extracellular region	-3,06	-0,70	
EPHA2	Q03145	integral to membrane	0,75	-0,73	
CD9	P40240	integral to membrane	0,73	-0,44	
COL1A2	Q01149	extracellular space	-7,57	-2,32	
BASP1	Q91XV3	plasma membrane	-6,56	-2,41	
IGFBP7	Q61581	extracellular region	-6,08	-4,67	
PTPRC	P06800	integral to membrane	-4,84	-5,74	
ANPEP	P97449	integral to membrane	-4,83	-4,87	
MGLL	O35678	membrane part	-4,81	-3,12	
OSMR	O70458	integral to membrane	-4,75	-2,88	
FILIP1L	Q6P6LO	membrane	-4,69	-3,59	
CTSS	Q3U5K1	membrane	-4,45	-6,31	
FABP5	Q05816	cytoplasm	-4,09	-7,11	
AGPAT4	Q8K4X7	integral to membrane	-4,05	-3,50	
SFTPC	P21841	intracellular part	-0,15	-5,57	
PTGIS	Q8BXC0	endoplasmic reticulum memt	-6,72	-1,93	
THBS1	P35441	extracellular space	-6,40	-1,54	
FBN1	O88840	extracellular matrix part	-5,99	-1,38	
DES	P31001	cell fraction;insoluble fraction	-5,68	-0,99	
ASS1	P16460	mitochondrion;organelle;mem	-4,83	-1,43	
PDLIM4	Q5SWV3	PDZ domain (Also known as	-6,15	0,37	
CDH11	P55288	cytoplasm;plasma membrane	-4,78	0,18	
CSPG4	Q8VHY0	integral to membrane	-4,35	-0,38	

Особый интерес к интегринам не случаен, поскольку именно они принимают активное участие в различных процессах сигнализации клеток, которые важны для нормального функционирования легкого. Однако не все представленные в таблице 2 интегринны могли быть выбраны в качестве маркеров.

Например, интергин Itga2, который также активно экспрессировался в клетках АТII, не мог быть выбран маркером, поскольку его экспрессия была значительно ниже, чем экспрессия генов интегринов бета-2 и бета-6 (табл.1).

4. Определение присутствия Itgb2 и Itgb6 в различных клеточных линиях мышей

Для подтверждения специфичности интегринов бета-2 и бета-6 для альвеолярных клеток типа II была проведена реакция обратной транскрипции (QRT-PCR) с количественным определением продуктов ПЦР на различных клеточных линиях.

Присутствие Itgb2 и Itgb6 определяли на клеточных линиях Mlg (нормальные клетки легких мыши), MFLM-4 (фетальные мезенхимные клетки легких мыши),АТII (альвеолярные клетки II типа), NIH/3T3 (мышинные фибробласты), клетках MLE-12 (клетки легочного эпителия), а также в Lung («целые легкие» мыши) (рис.6).

Результаты исследований показали, что интегринны бета-2 и бета-6, относящиеся к мембранным белкам, наиболее активно экспрессируются, в альвеолярных клетках типа II. В меньшем количестве (в среднем в 2 раза) данные белки определяются в целом легком.

Наличие Itgb2 и Itgb6 в целом легком объясняется тем, что альвеолярные клетки являются составной частью целого легкого и данные показатели являются результатом их синтеза.

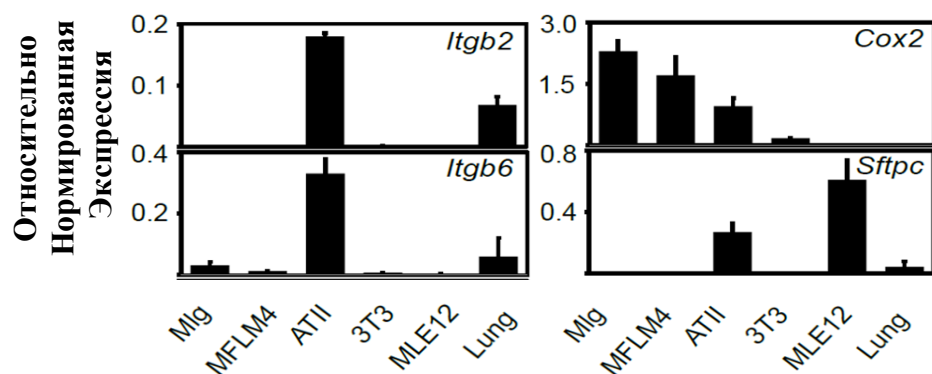


Рис 6. Определение специфичной экспрессии протеинов Itgb2 и Itgb6 на клеточных линиях мышей: Mlg - нормальные клетки легких мыши, MFLM-4 фетальные мезенхимальные клетки легких мыши, NIH/3T3- мышинные фибробласты, MLE-12- клетки легочного эпителия, АП- альвеолярные клетки типа II, Lung -клетки легких взрослой мыши.

Установлено, что интегрин бета-2 проявляет большую специфичность к клеткам АП по сравнению с интегрином бета-6, поскольку небольшое его количество обнаруживается в фетальных мезенхимных клетках легких мышей. Однако специфичность его остается на достаточно высоком уровне, поскольку экспрессия интегрин бета-6 полностью отсутствовала в легочном эпителии. В других линиях клеток мышей экспрессии данных белков не наблюдалось (рис.6).

Подтверждением достоверности специфичности интегринов Itgb2 и Itgb6 клеткам АП, служило определение наличия внутриклеточного белка Sftpc (proSP-C), как в клетках АП, так и в клетках MLE-12. На сегодняшний день этот белок

является лучшим маркером для клеток АП, несмотря на то, что он активно синтезируется и в клетках MLE-12, что отражено в диаграмме (рис.6). Однако, данный белок при проведении иммунного окрашивания в первично изолированных клетках АП, обнаруживается в гораздо большем количестве, чем в клетках MLE12, что позволяет его использовать в качестве маркера этих клеток.

Специфичность Itgb2 и Itgb6 была также доказана при изучении содержания белка на различных клеточных линиях легких и селезенке мыши (рис.7).

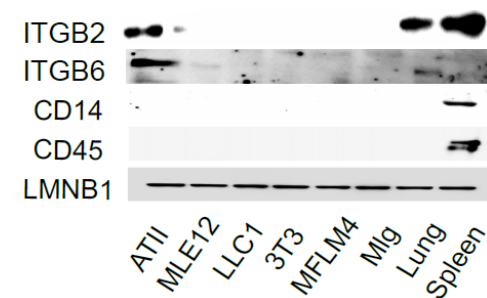


Рис.7. Анализ экспрессии Itgb2 и Itgb6 методом Вестерн-блоттинга на клетках легких и селезенке мыши: АП- альвеолярные клетки типа II, MLE-12 клетки легочного эпителия, LLC1- раковые клетки легких «Льюиса», NIH/3T3- эмбриональные фибробласты мышей, MFLM-4 фетальные мезенхимальные клетки легких мыши, Mlg - нормальные клетки легких мыши, и Lung -клетки легких взрослой мыши.

Как показали результаты, представленные на электрофорограмме, экспрессия генов интегринов (ITGB2 и

ITGB6) полностью отсутствовала на других клеточных линиях, кроме клеток АТII и в малых количествах в целом легком.

Однако, по результатам анализа Вестерн-блоттинга, экспрессия интегрин бета-2 наблюдалась также в клетках селезенки. Обнаружение в ней данного интегрин, по-видимому, связано с присутствием крови в данном органе. Известно, что интегрины относятся к лейкоцитам и их присутствие в селезенке, по-видимому, дает соответствующую реакцию.

Доказательством того, что интегрины бета-2 и бета-6 в изолированных клетках АТII, не являются результатом загрязнения альвеолярных клеток, клетками крови, являются пятна белков, которые характерны для крови и которые отсутствуют в клетках АТII.

Клеточная специфичность интегринов Itgb2 и Itgb6 была также доказана с помощью тестирования белковых экстрактов со специфическими моноклональными антителами - CD14 и CD45, которые являются маркерами для красных кровяных клеток – моноцитов, макрофагов.

Результаты иммунного окрашивания данного эксперимента не представлены, так как на фотографиях отсутствовала флюоресценция.

Отсутствие флюоресценции еще раз подтвердило, что наличие протеинов Itgb2 и Itgb6 в клетках АТII типа не является результатом их загрязнения клетками крови, поскольку реакция с антителами CD14 и CD45 наблюдалась, только в экстракте белка

селезенки, содержащей кровь, но отсутствовала в других белковых экстрактах.

Таким образом, результаты вестерн-блоттинга белковых экстрактов и их иммунного окрашивания подтвердили клеточную специфичность интегринов бета-2 и бета-6 относительно альвеолярных клеток типа II.

5. Определение содержания субпопуляций клеток АТII в легких взрослой мыши и присутствие в них интегринов бета-2 и бета-6

Дальнейшая детальная характеристика суммарных белков, подтверждающая специфичность интегринов для клеток АТII, была проведена с помощью проточной цитометрии с использованием специфических антител (Sftpc и/или Itgb2 или Itgb6), с одним (рис.8) или двойным (рис.9) действием.

Результаты исследований показали, что в составе суспензии клеток легких взрослой мыши, 13% клеток проявляют положительную реакцию на белок Sftpc, 7% - на интегрин бета-6 и 25% клеток - на интегрин бета-2 (рисунок 8).

Поскольку клеток, с положительной реакцией на интегрин бета-2 было в 2 раза больше, чем клеток с положительной реакцией на Sftpc, можно было предположить, что интегрин бета-2 имеет количественное преимущество перед белком Sftpc.

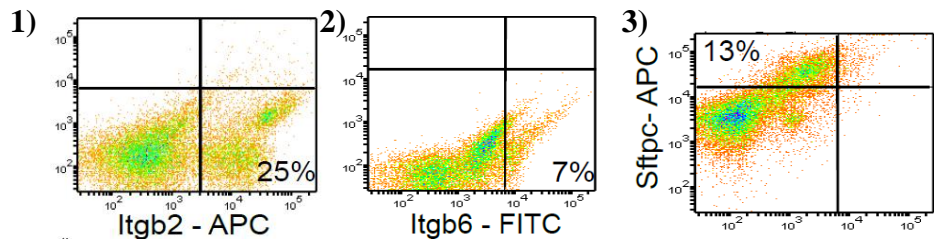


Рис.8. Анализ суспензии клеток взрослых легких с помощью проточной цитометрии после одного иммунного использования Sftpc и/или Itgb2 или Itgb6-специфических антител: 1 – Itgb2 окрашивание, 2 – Itgb6 окрашивание, 3 - Sftpc окрашивание.

Однако, анализ результатов эксперимента с двойным окрашиванием суспензии клеток легких взрослой мыши (рис.9) показал, что только 5% анализируемых клеток давали положительную реакцию на присутствие белка Sftpc и интегрин бета-2, а 6% клеток давали положительную реакцию на присутствие белка Sftpc и интегрин бета-6.

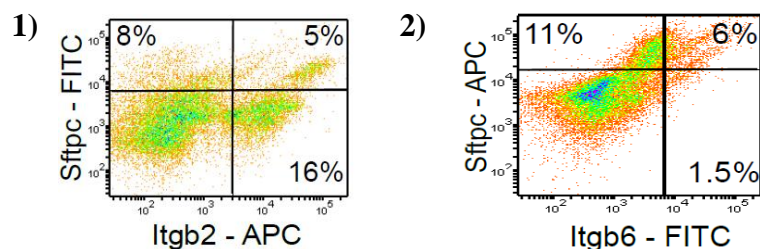


Рис.9. Анализ суспензии клеток взрослых легких с помощью проточной цитометрии после двойного иммунного использования Sftpc и/или Itgb2 или Itgb6-специфических антител: 1– двойное окрашивание proSPC/FITC-Itgb2/APC, 2 - двойное окрашивание proSPC/APC-Itgb6/FITC.

Кроме того, в результате используемого метода с двойным иммунным окрашиванием белка был установлен ранее неизвестный факт, о возможности существования клеток АТII в легких взрослой мыши, в виде двойной субпопуляции. На рисунке 9 отчетливо видно разделение фракций белка на два фрагмента, что является доказательством этого факта.

Таким образом, анализ окрашенных клеток, взаимодействующих со специфическими антителами доказал, что клетки АТII в легких взрослой мыши существуют в виде двух субпопуляций, каждая из которых содержит специфические интегрины бета-2 и бета-6. Популяция клеток АТII, содержит равное количество клеток, синтезирующих белок Sftpc и интегрины бета-2 и бета-6, что позволяет рассматривать данные интегрины как маркерные белки.

6. Определение локализации Itgb2 и Itgb6 в изолированных альвеолярных клетках типа II

Для определения локализации интегринов бета-2 и бета-6 в изолированных альвеолярных клетках типа II был использован метод двойного иммуноокрашивания срезов взрослого легкого, при использовании специфических антител, конъюгированных различными флюорохромами (рис.10-11).

Расположение окрашенных специфических антител в клетках АТII показало, что белки Sftpc и Itgb2 расположены в них относительно близко друг к другу, т.е. интегрин бета-2, возможно, находится во внутренней структуре клеток.

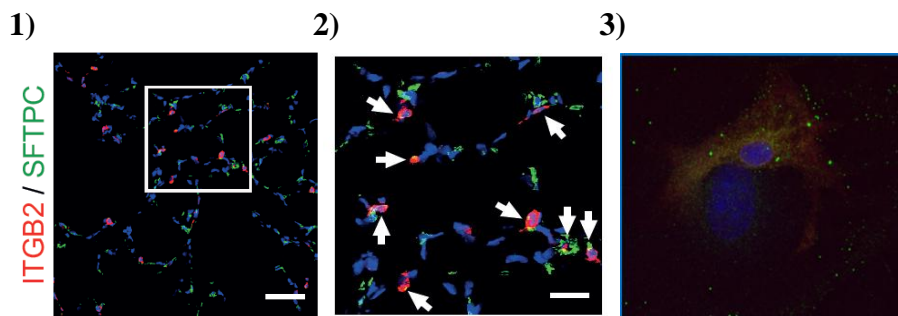


Рис.10. Двойное окрашивание протеинов SFTP-C и ITGB2 на поверхности изолированных альвеолярных клеток типа II и срезе легких. Рисунки воспроизведены с помощью конфокального микроскопа: 1), 2) при использовании специфических антител proSPC (Sftpc) - и Itgb2 на срезе легких при разных увеличениях, 3) те же протеины, но на клетках АТII. Окраска: DRAQ5- синего цвета окрашенные ядра, красного цвета- Itgb2, зеленого цвета- proSPC.

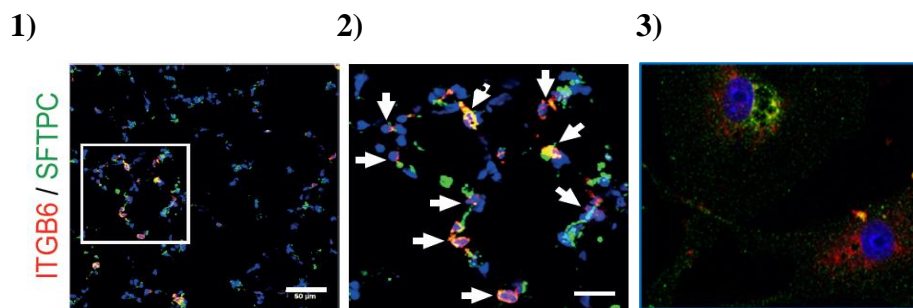


Рис. 11. Двойное окрашивание протеинов proSPC и Itgb6 на поверхности изолированных альвеолярных клеток типа II и срезе легких. Рисунки воспроизведены с помощью конфокального микроскопа: а), б) при использовании специфических антител proSPC и Itgb6 на срезе легких при разных увеличениях, в) те же протеины, но на клетках АТII.

Однако при иммунном окрашивании целого легкого мы наблюдали ярко выраженное поверхностное расположение интегринов, как интегрин бета-2, так и интегрин бета-6 (рис. 10). В данном эксперименте также было установлено, что содержание в клетках интегрин бета-6 было значительно меньше, чем содержание интегрин бета-2.

Таким образом, данный метод позволил определить локализацию белков в изолированных альвеолярных клетках типа II, а также на срезах легких. Используя иммунофлюоресцентное окрашивание срезов взрослого легкого, было установлено, что специфические белки Itgb2 и Itgb6 локализованы на поверхности клеток АТII.

Установленный, преимущественный синтез интегрин бета-2 на изолированных клетках II типа согласуется с данными экспрессии гена, ответственного за синтез данного белка, как в клетках типа АТII, так и в клетках «целого легкого», и полном отсутствии экспрессии синтеза интегрин бета-2 в клетках MLE-12 (рис.12).

На масс-спектрах экспрессии генов белков, наиболее высокий пик расположен в районе длины волны - 681.82, именно он характерен для интегрин бета-2 в клетках АТII. Второй пик с длиной волны 684.82 на первом рисунке отражает менее выраженную экспрессию данного белка на целом легком.

На втором рисунке показано соотношение экспрессии генов белков клеток MLE-12 к целому легкому, где практически экспрессия интегрин бета-2 отсутствовала.

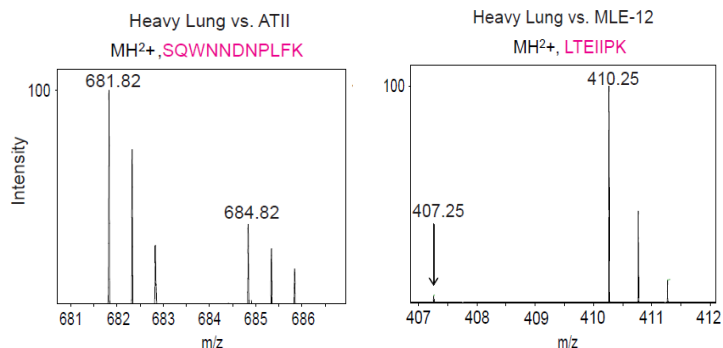


Рис.12. Масс-спектр экспрессии гена *Itgb2*: а) в клетках АТII по отношению к целому легкому, б) в клетках MLE-12 по отношению к целому легкому.

Таким образом, полученные результаты подтвердили преимущественную экспрессию гена интегрина бета-2 в клетках АТII и возможность его использования в качестве основного маркера для данных клеток.

7. Роль экспрессии гена интегрина бета-2 (*Itgb2*) в газообмене клеток легких мышей

Установлено, что нормальное функционирование клеток животных и человека зависит от определенного набора интегринов. Однако роль отдельных интегринов в процессах функционирования клеток изучена недостаточно. Поэтому следующим этапом наших исследований было определение роли экспрессии гена интегрина бета-2 в процессе газообмена легких мышей.

С этой целью в работе использовались мыши дикого типа (WT, C57BL/6) и мыши, у которых методом нокаута был

ингибирован ген, ответственный за синтез интегрина бета-2 (*Itgb2*^{-/-}).

Из литературы известно, что нокаут генов отдельных интегринов приводит к серьезным морфологическим и физиологическим изменениям в организме человека и животного (Kim et.al.,2005). Однако результаты наших исследований показали, что как мыши дикого типа, так и мыши с нокаутом гена интегрина бета-2 (*Itgb2*^{-/-}) нормально развивались, были подвижны и набирали вес (табл. 2). Кроме того, в поведении мышей разных групп также не было отмечено значительных изменений.

Интегрин бета-2 синтезируется в различных органах и тканях человека и животных. Синтезируется он и в легких.

Исследование структуры легких и легочной ткани мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрина бета-2 показало, что, как визуально, так и гистологически они мало отличались друг от друга. При отсутствии экспрессии интегрина бета-2 структура легких не была нарушена, она имела идеально белый цвет, что характерно для легких мышей нормального дикого типа.

На гистологических срезах легочной ткани мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрина бета-2 были видны бронхиолы, газовые пузырьки, на поверхности которых расположены альвеолярные клетки, но значительных различий в структуре срезов отмечено не было.

Таким образом, по морфологическим показателям мыши, подвергнутые нокауту, не отличались от мышей дикого типа.

Таблица 2.

Характеристика весового прироста мышей дикого типа и нокаут мышей

Время эксперимента	Средний вес мышей различного типа, г	
	Дикий тип (WT, C57BL/6)	Нокаут <i>Itgb2</i> ^{-/-}
5 недель	17,6 ±1,2	19,0 ±1,0
6 недель	18,3 ±1,2	19,5 ±1,3
7 недель	19,0 ±1,4	20,4 ±1,5
8 недель	22,8 ±1,5	23,0 ±1,6

Тем не менее, при сравнительном изучении концентрации вдыхаемого кислорода клетками мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрина бета-2 было установлено, что для мышей дикого типа данный показатель по среднеарифметическому значению был достоверно выше, чем у мышей с нокаутом гена интегрина бета-2 (рис.13). Если у мышей дикого типа давление на мембрану клеток составляло 120 ед., то для мышей с нокаутом гена интегрина бета-2 этот показатель был не более 70 ед.

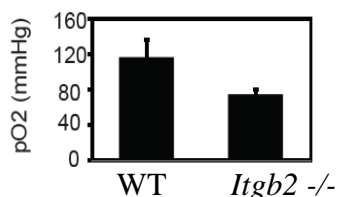


Рис.13. Измерения потребления кислорода клетками легких у мышей: 1 – мыши дикого типа (WT, C57BL/6); 2 – нокаут мыши (*Itgb2*^{-/-}).

Однако по количеству выдыхаемого углекислого газа достоверного различия между мышами дикого типа и мышами с нокаутом гена интегрина бета-2 не наблюдалось (рис.14). Данные показатели по давлению газа на мембрану у мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрина бета-2 составляли 40-45 ед.

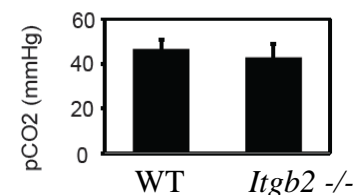


Рис. 14. Измерения выделения углекислого газа клетками мышей легких: 1 – мыши дикого типа (WT, C57BL/6); 2 – нокаут мыши (*Itgb2*^{-/-}).

Таким образом, результаты экспериментов показали, что у мышей с нокаутом гена интегрина бета-2 наблюдается нарушение процесса газообмена легких, когда количество вдыхаемого кислорода не соответствует количеству выдыхаемого углекислого газа. Следовательно, изучаемый нами интегрин бета-2 принимает участие в процессе газообмена легких.

8. Участие интегрина бета-2 в Wnt сигнализации клеток

Wnt сигнализация клеток - это один из сигнальных путей клеток животных, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку тканей и развитие раковых опухолей. Тщательный анализ имеющейся базы данных о белках мембранной фракции клеток АТН показал, что они обогащены белками, вовлеченными в Wnt сигнализацию.

Для изучения участия интегрина бета-2 в Wnt сигнализации клеток легких мышей, эксперименты проводились на животных с выключенным геном, ответственным за синтез интегрина бета-2 (*Itgb2*^{-/-}) и нормальным набором функционирующих генов (дикий тип). Анализ участия интегрина бета-2 в процессах Wnt сигнализации проводили с помощью определения концентрации клеток, содержащих бета-катенин (ABC), как основного медиатора и индикатора данного процесса (рис. 15-16).

Сравнение тканей мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрина бета-2 показало достоверное увеличение интенсивности флюоресценции бета-катенина в клетках *Itgb2*^{-/-} мышей, что свидетельствовало об активации процесса транскрипции белков Wnt сигнализации в данных клетках.

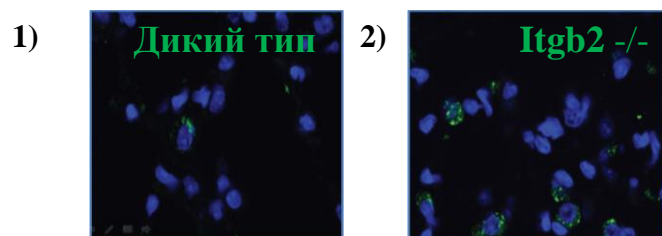


Рис. 15. Иммуноокрашивание ткани легких : 1) дикого типа, 2) с выключенным *Itgb2*^{-/-} геном. Окрашивание ядер- DRAQ5- синего цвета, активация белков Wnt сигнализации - зеленого цвета.

Известно, что концентрация бета-катенина в клетках коррелирует в них с интенсивностью канонической Wnt сигнализации. Таким образом, полученные результаты по

интенсивности флюоресценции бета-катенина в клетках *Itgb2*^{-/-} мышей, свидетельствует также о повышении канонической Wnt сигнализации после нокаута гена интегрина бета-2.

Повышение канонической WNT сигнализации было дополнительно подтверждено путем количественной оценки экспрессии генов легких взрослой мыши дикого типа (WT) и *Itgb2*^{-/-} мышами (рис.16).

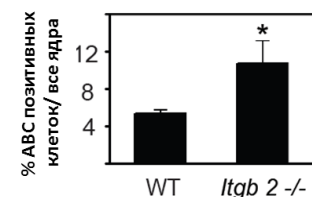


Рис.16. Количественная оценка ABC положительных клеток в легких дикого типа и *Itgb2*^{-/-} мышей после иммуноокрашивания. На оси ординат показано количество ABC-положительных клеток в процентах по отношению к общему числу клеток. Данные представлены в виде средних значений \pm S.E.M. (N = 3). Звездочки, P значения после одностороннего ANOVA, * P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05.**

Как видно из полученных результатов, количество клеток, содержащих бета-катенин для мышей дикого типа, составляет 5-6%, а для мышей *Itgb2*^{-/-} типа этот показатель равен 11-13%.

Таким образом, количество ABC-положительных клеток, для которых отмечается повышение канонической Wnt сигнализации, возрастает в среднем в 2,2 раза у мышей *Itgb2*^{-/-} типа, по сравнению с мышами дикого типа.

Влияние интегрина бета-2 на каноническую Wnt сигнализацию можно проследить с помощью анализа экспрессии маркеров WNT канонического пути. Результаты данного эксперимента представлены на рисунке 17.

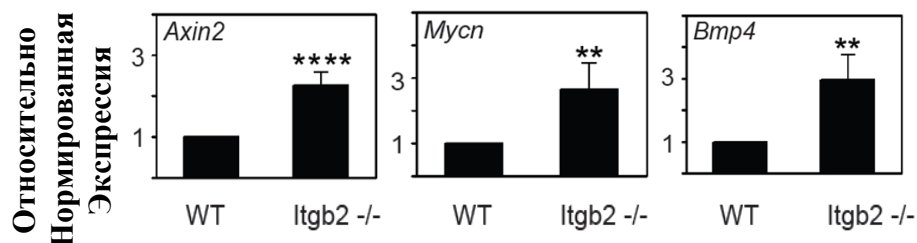


Рис.17. Анализ экспрессии указанных маркеров WNT сигнализации - Axin2, Bmp4, Mycn - представлены в количественном соотношении с помощью PCR реакции реального времени в легких взрослых мышей WT и Itgb2^{-/-} - типа. Данные представлены в виде средних значений \pm S.E.M. (в 4-х повторностях).

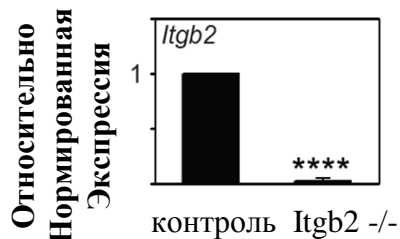


Рис.18. Анализ экспрессии Itgb2 с помощью PCR реакции реального времени в легких взрослых мышей WT и Itgb2^{-/-} - типа. Данные представлены в виде средних значений \pm S.E.M. (в 4-х повторностях).

Как видно из полученных результатов, нокаут Itgb2 мыши повышает экспрессию всех маркеров Wnt канонического пути в 2-3 раза.

Контролем данного эксперимента являются данные представленные на рисунке 18, где отмечена высокая экспрессия интегрина бета-2 в клетках мышей дикого типа и ее отсутствие в клетках мышей с нокаутом гена интегрина бета-2.

Данные экспрессии маркеров Wnt канонического пути подтверждаются также результатами Вестерн-блоттинга (рис.19).

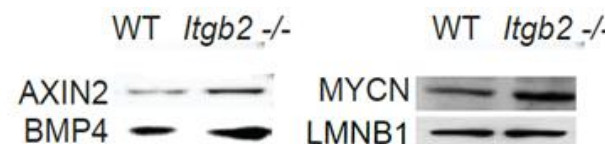


Рис.19. Результаты Вестерн-блоттинга экспрессии маркеров WNT канонического пути.

Как видно из полученной электрофореграммы, количество белков маркеров Wnt канонического пути выше в легких взрослых мышей Itgb2^{-/-} - типа, чем в легких мышей дикого типа.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что Itgb2 участвует в опосредованной негативной регуляции Wnt сигнализации клеток.

Чтобы подтвердить роль Itgb2 в опосредованной негативной регуляции Wnt сигнализации, мы трансфицировали плазмиду несущую гены белка Itgb2 в клетки MLE-12 (рис. 20). Для активации процесса Wnt сигнализации клетки MLE-12 были предварительно обработаны LiCl. Контролем служили необработанные клетки MLE 12.

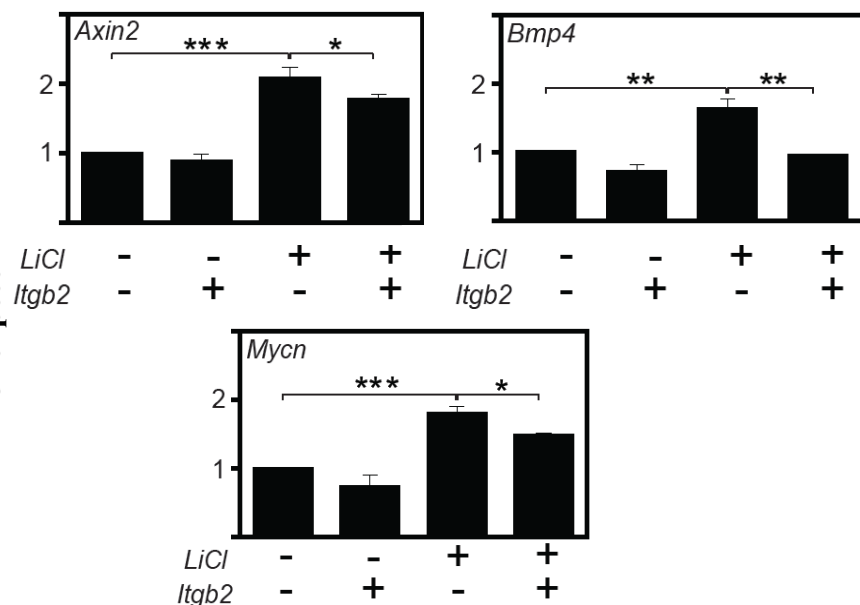


Рис.20. Анализ экспрессии генов - Axin2, Bmp4, Mycn. qRT-PCR на клетках MLE-12, которые не обрабатывали (UTR) или обработаны (Tr) LiCl и трансфицированные либо в контроль (-) или в мышь Itgb2 с экспрессионной плазмидой. Данные представлены в виде средних значений \pm S.E.M. (в 4-х повторностях).

Результаты исследований показали, что присутствие Itgb2, в клетках MLE-12, снизило уровень экспрессии специфических белков Wnt сигнального пути - Axin2, Bmp4 и Mycn. Особенно четко это снижение наблюдается на клетках, обработанных раствором хлорида лития, где снижение экспрессии генов для белка Bmp4 наблюдалось в среднем в 2 раза, а остальных маркеров в 1,3-1,5 раз.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что Itgb2 участвует в опосредованной негативной регуляции

Wnt сигнализации в легких взрослой мыши и, следовательно, в процессах эмбриогенеза, дифференцировки клеток и других, связанных с Wnt сигнализацией клеток.

ВЫВОДЫ

1. Получена суммарная фракция белков, специфичных для альвеолярных клеток АТII, состоящая из 26 протеинов, 90% из которых являются мембранными белками. Среди них выявлены наиболее активно экспрессирующиеся интегрины – это интегрины бета-2 и бета-6 (Itgb2 и Itgb6).
2. Методами иммунного окрашивания, проточной цитометрии, а также путем количественной оценки экспрессии генов легких мышей, доказана специфичность интегринов бета-2 и бета-6 для альвеолярных клеток типа II, выявлена их поверхностная локализация.
3. Установлено существование клеток АТII в легких взрослых мышей в виде двух субпопуляций, каждая из которых экспрессирует интегрины бета-2 и бета-6.
4. Доказано участие Itgb2 в газообмене легких, а также в процессе дифференцировки клеток, эмбриогенезе и других, связанных с Wnt сигнализацией. В первом случае, отсутствие Itgb2 в клетках вызывает нарушение нормального газообмена легких, во втором – наблюдается усиление процессов, связанных с Wnt сигнализацией.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Mukhametshina, R.T.** Quantitative Proteome Analysis of Alveolar Type-II Cells Reveals a Connection of Integrin Receptor Subunits Beta 2/6 and WNT Signaling / R.T. Mukhametshina, A. Ruhs, I. Singh, D. Hasan, A. Contreras, A.Mehta, V.S. Nikam, K. Ahlbrecht, G. Carraro, H.A. Cabrera-Fuentes, D. Jiang, R. Voswinckel, W. Seeger, S. Bellusci, K. Scharffetter-Kochanek, T.V. Bagaeva, K.T. Preissner, T. Boettger, T. Braun, M. Krüger, G. Barreto // J. Proteome Res. -2013.- V.12.-No12.-P.5598-5608.
2. **Мухаметшина, Р.Т.** Роль экспрессии гена интегрин бета 2 в газообмене клеток легких мыши / Р.Т.Мухаметшина, А. Мехта, К.Т. Прайснер, Г. Баррето, Т.В. Багаева // Ученые записки Казанского университета, Серия Естественные науки.-2013.- Т.155.-Кн.3.- С.183-186.
3. **Мухаметшина, Р.Т.** Альвеолярные клетки и их специфические маркеры / Р.Т.Мухаметшина, Г. Баррето, Т.В. Багаева // Материалы II Международной научной Интернет-конференции Биотехнология. Взгляд в будущее, 26-27 марта 2013.- С.226-229
4. **Мухаметшина, Р.Т.** Некоторые субпопуляции альвеолярных клеток типа II экспрессируют белки - интегрины бета 2 и бета 6, которые можно рассматривать как маркерные / Р.Т.Мухаметшина, Т.В. Багаева /1 Научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии».-Казань: ООО «Парк-медиа», 2013.- 97с.

5. Кабрера Фуентес, Э.А. Проникновение биназы в клетки альвеолярного эпителия легких не индуцируют их гибель /Э.А. Кабрера Фуентес, Н.В. Калачева, **Р.Т. Мухаметшина**, П.В. Зеленихин, А.И. Колпаков, Г. Баррето, К.Т. Прайснер, О.Н. Ильинская // Журнал Биомедицинская химия – 2012.- Т. 58.- Вып. 3.- С. 272-280.

Автор выражает глубокую признательность научным руководителям диссертационной работы д.б.н., проф. **Багаевой Т.В.** за внимательное отношение и помощь в работе над диссертацией, д.б.н., проф. **Баррето Г.** за неоценимую помощь при проведении экспериментальных исследований и советы в процессе выполнения диссертационной работы, д.б.н., проф. Прайснеру за предоставленную возможность проведения экспериментов в Институте имени Макса Планка (Германии), PhD студенту Адити Мехта, PhD Алехандро Кабрера, PhD Свену Беккер за ценные советы по выполнению данного исследования.

Просьба посылать отзывы на автореферат по адресу: 428008, Казань, ул.Кремлевская 18, Казанский (Приволжский)Федеральный Университет, отдел аспирантуры, Ученому Секретарю Диссертационного совета Д212.081.08 проф.Абрамовой З.И., факс (843)238-76-01

Email: attestat.otdel@ksu.ru